

JP32-9393

Title: Method of producing glutamic acid using a microorganism

Claims

A method of producing glutamic acid comprising culturing a microorganism having alpha-keto glutarate-producing ability in a culture medium that contains saccharide and an excess amount of nitrogen source that is more than required for growth of the microorganism, that is, the amount of the nitrogen source is more than 5% with respect to carbon source.

Example 5

Aerobacter aerogenes was cultured in a medium containing 5% sucrose, 0.8% ammonium nitrate, 0.3% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3% rice bran (pH7 with ammonium hydroxide) for 30 hours while maintaining pH between 5.5 to 7.0 in the same way as Example 1, and then the medium was supplemented with 0.4% ammonium nitrate and cultured for another 40 hours. Thereby, 0.3g/dl of glutamic acid was obtained.

Example 6

Aerobacter cloacae was cultured in the same way as Example 3 for 60 hours. Thereby, 0.2g/dl of glutamic acid was obtained.

Example 7

Serratia marcescens was cultured in the same way as Example 1 for 70 hours. Thereby, 0.2g/dl of glutamic acid was obtained.

Example 8

Serratia indica was cultured in the same way as Example 3 for 70 hours. Thereby, 0.1g/dl of glutamic acid was obtained.

36 F 0
(16 B 6)

特 許 公 報

特 許 出 願 公 告
昭32-9393

公告 昭 32.11.7 出願 昭 29.12.25 特願 昭 29-28361
(抗審 昭 30-2112)

発 明 者	多 田 靖 次	東京都杉並区永福町95
同	中 山 大 樹	神奈川県高座郡大和町下鶴間3362
出 願 人	味の素株式会社	東京都中央区宝町1の7
同	三楽酒造株式会社	同 所
代理人 弁理士	中 松 潤 之 助	外 2 名

(全 4 頁)

微生物を利用するグルタミン酸の製造方法

発明の詳細なる説明

本発明は微生物を利用するグルタミン酸の製造方法に関するものであり、その目的は安価なる糖質並に窒素源を原料として工業的に有利に、グルタミン酸を製造することにある。

多くの微生物、例えばBacillus, Pseudomonas, Aerobacter, Serratia, Acetobacter, Gluono-acetobacter, Escherichia, Saccharomyces, Aspergillus等が糖の代謝に於て、その中間生産物或は最終生成物として α -ケトグルタル酸、オキサザル酢酸、焦性葡萄糖等の α -ケト酸類を生成することは既に報告されて居るが、これ等のケト酸類は生化学的に不安定（速に次の代謝過程に転移する）なること、若しくは醗酵液よりの分離が困難なること等の理由により工業上の利用にまでは至っていない。

本発明者等はこの糖の代謝過程に着目し、糖質を基とした培養基中にアムモニウム塩等の窒素源を過剰量に加え、これ等の微生物を培養したところ、これ等の生成ケト酸はグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン等の α -アミノ酸に転移し、液中に α -アミノ酸が生成蓄積されることを発見し、これを実用化して糖質とアムモニウム塩等の安価なる窒素源より有用なるアミノ酸の製造に成功した。

さて、生物の代謝過程に於て α -ケト酸が窒素と結合して α -アミノ酸となり更にこのアミノ酸が多数結合して蛋白の合成が行われるとする学説も報ぜられて居り、これは今日では蛋白生成の機作に関する定説とされている。即ち、糖質とアムモニウム塩等の窒素源より微生物菌体が増殖して行く過程を説明するものである。

本発明者等は現在の生化学的重要命題の一つであるこの生体蛋白合成の理論、即ち α -ケト酸→ α -アミノ酸の転移の過程を、調味料として最も重要なグルタミン酸の製造に応用せんとし、従つて、糖より α -ケト酸生産能を有する微生物に糖質と共にアムモニウム塩等の窒素源を与えて培養したところの菌体の増殖度は窒素源の量を増しても一定限界以上には増えないにも拘わらず、培養基に入れた窒素源は引きつゞき著しく消費されて居ることを発見した。即ち、菌体増殖にアムモニウム塩等が利用されるのは従来の定説通りであるが、更に過剰分のアムモニウム塩等は菌の代謝によりグルタミン酸等のアミノ酸となつて培養基中に出現することを見出した。

即ち、アムモニウム塩等の窒素源を菌体の増殖に必要以上に糖質と共に培養基に添加するときはこれ等の微生物は菌体生成以外に量的には遙に大量の窒素の代謝を行い、菌体成分以外に α -アミノ酸を集成し、 α -ケトグルタル酸生成能を有する微生物の場合に於ては対応するアミノ酸たるグルタミン酸（他に微量のアスパラギン酸、アラニン、グリシン等を確認）が多量に集成された。即ち、本発明に従えばグルタミン酸を製造するに当り、原料として糖質及び安価なる窒素源、例えばアムモニウム塩等より出発出来るもので、極めて劃期的なものと云い得る。

本発明の方法を実施するに当つて、糖質としては、甘藷、馬鈴薯、小麦、玉蜀黍、キャッサバ等の澱粉質原料、及びそれよりの澱粉、並びにそれ等の糖化液：蔗糖、葡萄糖、乳糖、糖蜜、乳糖等の糖質が用いられる。窒素源としては微生物の培養に通常用いられるものは何れも使用し得るが、

実用的には、無機窒素源例えば硫酸、塩酸、硝酸、燐酸、炭酸アモニウム、水酸化アモニウム、酒石酸アモニウム、硝酸加里、硝酸ソーダ等、並に有機窒素源例えば尿素等を主として用い、その他グルテン、カゼイン、種々の蛋白加水分解物、ペプトン、大豆粕、麩、米糠、酵母エキス、コーンステープリカー、デイスティラーズ・ソリユーブル等が補助的に用いられる。微生物としては、糖質より α -クトグルタル酸生成能を有するもの、例えばBacillus, Pseudomonas, Aerobacter, Serratia, Acetobacter, Gluconacetobacter, Escherichia, Saccharomyces, Aspergillus等が用いられる。

培養に当つては、上記の糖質原料に上記の窒素源を菌体の増殖生活に必要とする量以上に加え、加里、燐酸、苦土、その他の成分の適量を添加し苛性ソーダ、水酸化アモニウム等を以てpHを6～8に調整して培養基を作成し、滅菌後上記の微生物の1種又は2種以上を接種し、通気しつつ20～40℃に培養する。培養中に必要に応じて苛性ソーダ、水酸化アモニウム、炭酸石灰等を添加してpHを調節する。又、糖質並に窒素源は培養の当初に全量が添加される場合もあり、培養中に数回に分割して添加される場合もある。培養により菌は旺に増殖し、糖質及び窒素源を代謝して蛋白合成即ち菌体生成が行われるが、添加せる過剰の窒素源は菌体に固定される分を遙に超えてアミノ酸に*

*転移し、培養基中のアミノ態窒素（主としてグルタミン酸）は著しく増加する。アミノ態窒素が最高値を示した時に培養を終了する。

培養終了液は濾過して、真空蒸発器を用いて濃縮し酸を加えpH 3～4としてグルタミン酸を晶析させるか又はイオン交換樹脂を用いてグルタミン酸を吸着、溶出し、溶出液を濃縮後冷却してグルタミン酸を晶出させ、遠心分離機によつて分離し更に再結晶製して純グルタミン酸を得る。

元来、通常の菌体増殖或は一般の醗酵工業に用いられる窒素は培養基の仕込糖濃度5～15%に於ては窒素として0.02～0.08%即ち炭素：窒素=100：0.5～2（何れも有効成分）で十分でありそれ以上の大量は無駄乃至はそれ等の目的には不利とされて居るが、本発明にあつては、炭素100に対して窒素は5以上となることを必要とし、培養の全期間中に添加する全炭素量と全窒素量との比が100：5～50を常用とするものであり、培養基中の糖濃度5～10%に対して窒素として0.1～2.0%を実用範囲とするものである。この多量の添加窒素量に対しては、菌体成分として固定される窒素量は其の数%通常5～6%以下に過ぎず、一方蓄積されたアミノ酸中に移行する窒素量は其の30～80%にも達する。次に窒素添加量と菌体並にグルタミン酸の生成に関する一実験例を示せば第1表の如くである。

第 1 表		炭素：窒素		グルタミン酸(g/dl)		菌 体 (g/dl)	
				(A)	(B)	(A)	(B)
硫酸 (%)	窒素 (%)						
0.1	0.02	100	1	—	—	0.10	0.15
0.2	0.04	"	2	—	±	0.32	0.35
0.3	0.06	"	3	±	±	0.48	0.47
0.5	0.11	"	6	0.23	0.50	0.54	0.49
1.0	0.21	"	11	0.38	1.18(※54)	0.57	0.50(※6)
1.5	0.31	"	16	0.50	1.42(※43)	0.60	0.51(※4)
2.0	0.42	"	21	0.54	1.46(※33)	0.55	0.54(※3)
3.0	0.63	"	32	0.43	1.25	0.57	0.57
4.0	0.84	"	42	0.35	1.07	0.49	0.51
5.0	1.05	"	53	0.20	0.58	0.40	0.39
6.0	1.27	"	64	0.06	0.18	0.31	0.28

(註) 1. 培養基組成：葡萄糖5%， KH_2PO_4 0.2%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%，ペプトン0.2%に硫酸を添加、培養中pHを苛性ソーダで6～7に調節

2. 菌株：(A) *Pseudomonas fluorescens*, (B) *Bacillus cereus*

3. 培養：フラスコ振盪培養、30℃、3日

4. ※： $\frac{\text{グルタミン酸又は菌体の窒素}}{\text{添加窒素}} \times 100$

即ち、菌体量は窒素0.06~0.11%に於てすでに最高値に近い値を示すが、グルタミン酸は一般に用いられる窒素濃度0.02~0.06%ではその集積は殆ど認められず、窒素0.21%以上になつて始めて*

* 著量の生成を示す。

次に、本発明に於ける醗酵経過、特にα-ケトグルタル酸とグルタミン酸の生成関係についての一実験例を示すと第2表の如くである。

培養時間 (時間)	第 2 表		α-ケトグルタル酸(g/dl)		菌体(g/dl)	
	グルタミン酸(g/dl)					
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
24	0.15	0.10	0.18	0.06	0.27	0.25
48	0.38	1.21	0.32	0.03	0.50	0.55
72	0.62	1.45	0.22	±	0.52	0.50
96	0.55	1.06	0.08	±	0.50	0.47

(註) 1. 培養基組成：葡萄糖5%、硫酸1.5%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%、ペプトン0.2%培養中PHを水酸化アモニウムを以て6~7に調節。

2. 菌株：(A) *Pseudomonas fluorescens*, (B) *Bacillus cereus*

3. 培養：フラスコ振盪培養、30℃

即ち、(A)に於てはグルタミン酸の生成と共にα-ケトグルタル酸も培養基中に或る程度集積され、(B)に於てはα-ケトグルタル酸の集積なきまゝにグルタミン酸が生成集積される。(B)はケト酸の生成速度よりそのアミノ化の代謝過程が早い場合であり、ケト酸は生成直後消費されるのである。

第1, 2表より明らかなる如く、α-ケトグルタル酸の代謝過程をグルタミン酸の方向に進めるためには過剰の窒素源の存在が必要であり、この場合に窒素量が通常の醗酵程度あればα-ケトグルタル酸よりグルタミン酸に至る反応は殆ど進行せずグルタミン酸の生成は微量に過ぎず、窒素源を過剰に加えた場合に始めて著量のグルタミン酸を生成するものである。

斯様に、本発明は微生物培養法としても従来の観念の枠を全く外したものであり、生菌体による窒素源の工業的利用法として全く新しい一つの型を生み出したと云うべきである。以下に実施例により説明する。

実施例 1

糖質として甘藷澱粉酸糖化液を用い、糖濃度5%、硫酸2.0%、 KH_2PO_4 0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.05%、ペプトン0.1%、炭酸石灰2.0%、苛性ソーダでPHを7.0に調節した培養基10lを15l容小型醗酵槽に仕込み *Bacillus cereus* を接種して毎分液量と等量の空気を通じ500 r.p.mの攪拌を行い、大豆油を適時添加して発泡を防止し30℃に培養する。培養基中のグルタミン酸は40時間頃より著しく増加し、60時間頃には最高となり1.2g/dlを示した。この醗酵液を濾過して約1/2容に濃縮し、塩酸を加えてPH3とし、5℃に冷却してグルタミン酸を晶出せしめ、分離して粗結晶(1)92gを得母液を更に1/2容に濃縮し、同様にして粗結晶(2)26gを得た。(1),(2)を合して再結し精製結晶91gを得た。

実施例 2

窒素源として硝酸ソーダ1.8%を用い、その他は実施例1の如き組成の培地(但し、炭酸石灰は加えない)に *Bacillus subtilis* を接種し、実施例1と同様に培養し30時間でグルタミン酸は0.8g/dlに達した。この醗酵液を濾過してPH5.0に調節し60℃に加熱して炭酸ガスを追出した後、強酸性陽イオン交換樹脂にて処理し液中のグルタミン酸を吸着せしめ、次いで苛性ソーダ水溶液により溶出し、溶出液を濃縮後冷却しグルタミン酸を結晶さ

せて分離、結晶63gを得た。

実施例 3

葡萄糖5%、尿素1.0%、 KH_2PO_4 0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、酵母エキス0.2%、炭酸石灰1.0%苛性ソーダによりPH7.0に調節した培養基に *Pseudomonas fluorescens* を接種し、実施例1と同様に培養する。60時間でグルタミン酸は0.4g/dlを示した。

実施例 4

窒素源として塩安1.2%を用い、炭酸石灰1.5%その他は実施例3と同じ組成の培養基を調製し、*Pseudomonas ovalis* を接種し、30時間までは通気量を毎分液量の1.5倍とし、以後は液量の1とし更に40時間培養する。その他の操作は実施例1に準じ、グルタミン酸0.3g/dlを得た。

実施例 5

蔗糖5%、硝安0.8%、 KH_2PO_4 0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、米糠0.3%、水酸化アモニウムでPH7.0に調節した培養基に *Aerobacter aerogenes* を接種し水酸化アモニウムでPHを5.5~7.0に調節しつつ実施例1と同様に30時間培養し更に硝安0.4%を補充して、引きつゞき40時間培養し、グルタミン酸0.3g/dlを得た。

実施例 6

実施例3と同様にして *Aerobacter cloacae* を接種、培養し30時間でグルタミン酸0.2g/dlを得た。

実施例 7

実施例1と同様にして *Serratia marcescens* を接種、培養し70時間でグルタミン酸0.2g/dlを得た。

実施例 8

実施例3と同様にして *Serratia indica* を接種、培養70時間でグルタミン酸0.1g/dlを得た。

実施例 9

実施例1と同様にして *Acetobacter aceti* を接種、培養し、60時間でグルタミン酸0.1g/dlを得た。

実施例 10

窒素源を酒石酸アモニウム2.0%とし炭酸石灰無添加の他は実施例1と同一組成の培地に *Gluconoacetobacter cerinus* を接種し、苛性ソー

ダの添加によりPHを5.5~7に調節しつつ培養し、70時間でグルタミン酸0.1g/dlを得た。

実施例 11

窒素源として塩安0.8%及びグルテン分解液1.0%を用い、炭酸石灰1.2%を加えその他は実施例3と同様にして、*Escherichia coli* を接種、培養70時間でグルタミン酸0.3g/dlを得た。

実施例 12

窒素源に塩安1.2%を用い炭酸石灰を1.8%としその他は実施例1に準じて、*Escherichia freundii* を接種、培養70時間でグルタミン酸0.2g/dlを得た。

実施例 13

糖質として小麦澱粉酸糖化液を使用し、その他は実施例1に準じて *Saccharomyces cerevisiae* を接種し、70時間培養によりグルタミン酸0.1g/dlを得た。

実施例 14

実施例2に準じ、*Saccharomyces ellipsoideus* を接種、培養70時間にしてグルタミン酸0.1g/dlを得た。

実施例 15

葡萄糖5%、硝安1.0%、 KH_2PO_4 0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、酵母エキス0.1%、水酸化アモニウムでPH6.0に調節した培養基に *Aspergillus oryzae* を接種し、毎分液量の1.5倍量の通気を行い水酸化アモニウムでPHを5.5~6.5に調節しつつ実施例1と同様に培養し、80時間グルタミン酸0.3g/dlを得た。

実施例 16

糖質として甘藷澱粉酸糖化液を用い、糖濃度5%、硫安1.8%、炭酸石灰2.0%その他の組成は実施例15と同様の培地に *Aspergillus niger* を接種し、毎分液量の1.5倍量の通気を行いつつ80時間培養しグルタミン酸0.2g/dlを得た。

特許請求の範囲

糖質に菌体の増殖生活に必要な以上の窒素の過剰量、即ち炭素100に対して窒素5以上となる如く窒素源を加えた培養基にα-ケートグルタル酸生産能を有する微生物を培養することを特徴とする微生物を利用するグルタミン酸の製造方法。